斜纹夜蛾酵母双杂交文库的构建及其在蜕皮激素受体互作蛋白筛选中的应用

范琳芳[1,#]，何文婧[1,#]，苏智仁[1]，朱家明[1]，罗　威[1]，张　纯[2]，黄立华[1,*]

（1. 华南师范大学生命科学学院，广州市昆虫发育调控与应用研究重点实验室，广州 510631；
2. 广东省农业科学研究院植物保护研究所，广东省植物保护新技术重点实验室，广州 510640）

摘要：【目的】蜕皮激素在昆虫变态发育中起着关键的调控作用。蜕皮激素活化为20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone, 20E)后与蜕皮激素受体二聚体〔蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)和超气门蛋白(ultraspiracle protein, USP)〕结合,启动20E诱导的级联反应。本研究旨在从互作蛋白角度探究EcR/USP自身调控的分子机理。【方法】以重要农业害虫斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 为研究对象,通过构建酵母双杂交筛选系统分别筛选了与EcR和USP相互作用的蛋白。【结果】文库转化效率达到 3.0×10^6 cfu/μg,文库滴度达到 1.3×10^8 cfu/mL,文库插入片段大小在500~2 000 bp之间。4种诱饵质粒(EcRA/pGBKT7, EcRB1/pGBKT7, USP1/pGBKT7和USP2/pGBKT7)对酵母细胞无毒性,并且无自激活性,说明构建的酵母双杂交文库质量可靠。用以上4种诱饵质粒筛选酵母双杂交文库,共得到110个互作蛋白,其中与EcRB1, USP1和USP2互作的蛋白分别有26, 52和32个,未筛选到与EcRA互作的蛋白。随后,从中挑选了DnaJ-5(Hsp40 homolog 5, 一种热激蛋白分子伴侣),MBF2(mediator of BmFTZ-F1 type 2, 一种转录共激活子),polyubiquitin(多聚泛素类蛋白),esr16(ecdysteroid regulated 16kDa protein, 一种蜕皮激素调控蛋白)和NEDD8-like(neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein 8, 一种泛素调节相关蛋白)5种蛋白,利用酵母双杂交和Far-Western印迹法进一步验证了蛋白间的互作关系。【结论】分子伴侣和泛素化修饰等在蜕皮激素受体调控中可能起着重要作用。本研究对深入理解昆虫变态发育的分子机理具有重要意义。

关键词：斜纹夜蛾；变态发育；蜕皮激素受体；酵母双杂交文库；互作蛋白

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2016)08-0801-11

Construction of yeast two-hybrid system and its application in screening the interacting proteins of ecdysone receptors in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

FAN Lin-Fang[1,#], HE Wen-Jing[1,#], SU Zhi-Ren[1], ZHU Jia-Ming[1], LUO Wei[1], ZHANG Chun[2], HUANG, Li-Hua[1,*] (1. Guangzhou Key Laboratory of Insect Development Regulation and Application Research, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 【Aim】 Ecdysone plays a key role in insect metamorphosis. It is firstly activated into 20-hydroxyecdysone (20E) and then binds to its dimer-receptor composed of ecdysone receptor (EcR) and

基金项目：国家自然科学基金项目(31172154)；广东省自然科学基金项目(2015A030313390)；广州市科技计划项目(201510010055)；2015年广东省"大学生创新性实验计划项目"

作者简介：范琳芳，女，1992年1月生，江西抚州人，硕士研究生，主要从事昆虫变态发育的分子机理研究，E-mail：775762691@qq.com；何文婧，女，1991年5月生，甘肃陇西人，硕士研究生，主要从事昆虫变态发育的分子机理研究，E-mail：596245520@qq.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: huanglh@scnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-04-07；接受日期 Accepted: 2016-07-13

ultraspiracle protein (USP) to initiate 20E-induced cascade reaction. This study aims to explore the regulation mechanisms of EcR/USP from the aspects of protein interaction. 【Methods】A yeast two-hybrid system was constructed to screen the interacting proteins of EcR and USP from *Spodoptera litura*, an important agricultural pest. 【Results】The transformation efficiency of yeast library was 3.0×10^6 cfu/μg, the library titer was 1.3×10^8 cfu/mL, and the insert length was 500 - 2 000 bp. The four bait plasmids (EcRA, EcRB1, USP1, USP2/pGBKT7) showed no obvious toxicity to yeast cells and had no autoactivation ability, suggesting that the yeast library is qualified for the next screening of interacting proteins. After screening the library using four bait plasmids, a total of 110 interacting proteins were obtained, including 26 EcRB1-interacting proteins, 52 USP1-interacting proteins, and 32 USP2-interacting proteins. However, no protein was identified to interact with EcRA. Subsequently, five proteins, including DnaJ-5 (Hsp40 homolog 5, a kind of heat shock protein chaperone), MBF2 (mediator of BmFTZ-F1 type 2, a transcriptional co-activator), polyubiquitin, esr16 (ecdysteroid regulated 16 kDa protein), and NEDD8-like (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated protein 8, a ubiquitylation-related protein), were selected and their interactive relationship with EcR/USP was further confirmed by both yeast two-hybrid and Far-Western blotting. 【Conclusion】Our data suggest that heat shock protein chaperone and ubiquitylation may play roles in the regulation of EcR/USP, and this will contribute to the understanding of insect metamorphosis.

Key words: *Spodoptera litura*; metamorphosis; ecdysone receptor; yeast two-hybrid library; interacting protein

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*，属鳞翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Noctuidae)，主要分布于热带和亚热带地区，是一种能危害 99 科 290 种以上农作物的蔬菜害虫，给农业生产造成了巨大的危害(Lan *et al*., 2009)。昆虫变态发育主要受保幼激素(juvenile hormone, JH)和蜕皮激素(ecdysone)两种信号调控(Riddford, 1994)。其中，蜕皮激素[主要是其活化后的 20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone, 20E)]介导昆虫的蜕皮过程，而 JH 使昆虫保持幼虫状态。在 20E 和 JH 介导的昆虫变态发育过程中，蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)和超气门蛋白(ultraspiracle protein, USP)起着至关重要的作用。蜕皮激素首先与蜕皮激素受体 EcR/USP 二聚体结合，并激活一系列早期反应基因，如转录因子 Broad-Complex (BR-C)和 E74 等的表达(Burtis *et al*., 1990; DiBello *et al*., 1991)，随后这些转录因子诱导后续晚期基因的表达，从而调控昆虫的蜕皮和变态等生理变化。由此可见，蜕皮激素受体在昆虫生长发育和变态过程中起着至关重要的作用。

蜕皮激素受体由 EcR 和 USP 组成的异源二聚体组成。EcR 和 USP 都属于甾醇类核受体，这类核受体通常具有 5 个典型的结构域，包括 N 端 A/B 结构域，DNA 结合结构域(DBD, 又称 C 结构域)，铰链区 D 结构域，配体结合结构域(LBD, 又称 E 结构域)和 F 结构域。根据 EcR 的 N 端 A/B 结构域差异，可将 EcR 分为 EcRA, EcRB1 和 EcRB2 3 种同源物(Henrich, 2009)。然而，仅在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等少数昆虫中鉴定出了这 3 种 EcR(Talbot *et al*., 1993)。其他绝大多数昆虫(Wang *et al*., 2002)及多数鳞翅目昆虫仅编码 EcRA 和 EcRB1 这两种 EcR 同源物(Swevers *et al*., 1995; Jindra *et al*., 1996; Perrera *et al*., 1999)；此外，大多数昆虫的 USP 基因也存在两种不同的同源物，USP1 和 USP2(Jindra *et al*., 1997)。

EcR/USP 通常与多种蛋白互作，从而形成复杂的受体复合体。热激蛋白 90(heat shock protein 90)和 70(heat shock protein 70)是多种甾醇类核受体复合物的重要组成部分(Pratt and Toft, 1997; Pratt *et al*., 2004)，并且有研究表明，EcR/USP 只有与热激蛋白分子伴侣作用以后才具有 DNA 结合能力，进而参与其他基因的转录调控(Arbeitman and Hogness, 2000)。在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中，通过 Pull-down 实验表明，Hsc70 (heat shock protein cognate 70) 与 USP1 存在相互作用(Zheng *et al*., 2010)。Taiman(TAI)是在果蝇中鉴定出来的一种甾醇类受体辅激活蛋白。在活体实验中，TAI 与 EcR 和 USP 定位于相同的细胞位置，可以增强蜕皮激素诱导的转录反应，并且可以与 EcR 免疫共沉淀(Bai *et al*., 2000)。Alien 是最初从果蝇的基因组中被鉴定的一种核激素受体的抑制因子(Papaioannou *et al*.,

2007)。Alien 可以结合在核受体 EcR 和 SVP 的沉默结构域(Dressel *et al.*, 1999)。MET (methoprene-tolerant) 是一种转录调控因子。Bitra 和 Palli (2009)发现在离体条件下 MET 可以同 EcR 和 USP 发生相互作用。TRR(trithorax-related protein)是一种组蛋白甲基转移酶。在 20E 诱导的果蝇 S2 细胞中,TRR 与 EcR 和三甲基化的 histone-3 蛋白一起形成复合物,并结合于 hedgehog 的启动子部位来调控 hedgehog 基因的转录(Sedkov *et al.*, 2003)。SMRTER(SMRT-related ecdysone receptor-interacting factor)通过 LXXLL 氨基酸模体(L 指亮氨酸,X 指任意氨基酸)与核受体包括 EcR 相互作用(Tsai *et al.*, 1999; Sedkov *et al.*, 2003)。这些互作蛋白通过影响靶蛋白的亚细胞定位、与配体的结合、转录激活等方面对蜕皮激素受体的功能产生一定的调控。

酵母双杂交是研究蛋白质相互作用的一种经典的方法。它利用真核转录因子 GAL4 的转录激活特性来工作(Fields and Song, 1989)。GAL4 包含了两个在结构上独立,在功能上相互依存的结构域:DNA 结合结构域(DNA binding domain, DBD)和转录激活结构域(activation domain, AD)。DNA 结合结构域能够识别并结合于目标基因的上游激活序列(upstream activating sequence, UAS),转录激活结构域能够携带细胞中其他转录因子并结合于 DNA 结合结构域,从而形成功能上完整的转录因子。将反转录形成的 cDNA 作为靶蛋白(prey)基因与 AD 序列融合转化到文库菌株中,同时将诱饵蛋白(bait)基因与 BD 序列融合。当文库菌株和诱饵菌株融合后,若文库中有靶蛋白与诱饵蛋白相互作用则会引起 AD 和 BD 在空间上的靠近,从而激活下游报告基因的表达。采用这种方法可以大范围筛选和诱饵蛋白互作的蛋白。酵母双杂交系统检测的是基因表达产物的累积效应,所以敏感性较高,可以检测到蛋白之间暂时或者比较微弱的作用(Van Aelst *et al.*, 1993)。另外,该方法省去了免疫共沉淀等方法中蛋白表达、蛋白纯化等步骤,使实验更高效。再者,实验在酵母菌中进行,可在一定程度上代表研究材料细胞内的真实情况。

酵母双杂交方法已被广泛应用到蛋白质互作研究中。Uetz 等(2000)利用酵母双杂方法,检测了 1 004种酵母蛋白质之间的 957 种潜在的相互作用。另外,酵母双杂交的方法也常被用于某些核受体互作蛋白的筛选与鉴定中。Nagpal 等(1999)鉴定出了与视黄醛受体(retinoic acid receptors, RARs)相互作用的两种蛋白 HMG-1 和 HMG-R。本研究利用酵母双杂交技术,筛选与斜纹夜蛾蜕皮激素受体互作的蛋白,利于揭示变态发育过程中蜕皮激素受体自身调控的分子机理。

1　材料与方法

1.1　试虫

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫来自中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室,按照 Huang 等(2011)方法在本实验室中稳定传代培养 10 年以上。

1.2　蜕皮激素受体(EcR/USP)诱饵质粒的构建

以斜纹夜蛾 cDNA 为模板,设计特异性 PCR 引物(表 1),扩增 *EcRA*(GenBank 登录号: HM046618), *EcRB*1(JQ730731), *USP*1(JQ730733)和 *USP*2(JQ730734) 4 个基因的 ORF(open reading frame)。PCR 采用 20 μL 体系,包括 10 × buffer 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 0.4 μL,10 μmol/L 的上下引物各 0.4 μL,rTaq 酶 0.2 μL,cDNA 模板 2 μL,加 ddH_2O 至 20 μL;反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 2 min,35 轮循环; 72℃ 10 min。随后,参照 Make Your

表 1　引物序列

Table 1　Sequences of the primers

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
EcRA_5′ primer	CCATGGATGGACTTGAAGCACGAGGTAG	克隆 *EcRA* 的 ORF
EcRA_3′ primer	GGATCCAGTCTATGAGCGTTCTCTCCTGA	Cloning of the ORF of *EcRA*
EcRB1_5′ primer	CCATGGATGTCCATAGAGTCGCGTTTAG	克隆 *EcRB*1 的 ORF
EcRB1_3′ primer	GGATCCTAGCCAGTCTATGAGCGTTCTC	Cloning of the ORF of *EcRB*1
USP1_5′ primer	GAATTCATGTCAGTGGCGAAGAAAGATAA	克隆 *USP*1 的 ORF
USP1_3′ primer	GGATCCTATGGTTACATGACGTTGGCG	Cloning of the ORF of *USP*1
USP2_5′ primer	GAATTCATGATGGAGCCCTCGAGAGAT	克隆 *USP*2 的 ORF
USP2_3′ primer	GGATCCTATGGTTACATGACGTTGGCG	Cloning of the ORF of *USP*2
5′ primer	TTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGG	扩增双链 cDNA
3′ primer	GTATCGATGCCCACCCTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACA	Amplification of dscDNA

Own "Mate & Plate™" Library System (Clonetech, Mountain, USA)试剂盒说明书,将 PCR 产物分别连接入 pGBKT7 载体,从而获得 4 种诱饵质粒: EcRA/pGBKT7, EcRB1/pGBKT7, USP1/pGBKT7, USP2/pGBKT7。

1.3 诱饵质粒毒性和自激活效应检测

将这 4 种诱饵质粒和空载的 pGBKT7 分别转化 AH109 酵母,将转化液涂布于 SD/-Trp 琼脂平板,培养 3 d 后观察并对比各个平板生长状况,以检测诱饵质粒对酵母细胞的毒性效应。为检测诱饵质粒是否具有自激活性,将诱饵质粒和 pGADT7 共转化 AH109,取稀释的菌液涂布 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/X-α-Gal 平板 ,观察菌株生长状况,菌落产生蓝斑表示有自激活性。同时转化 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 作为阳性对照,转化 pGBKT7-lam 和 pGADT7-T 作为阴性对照。具体操作参见 Make Your Own "Mate & Plate™" Library System (Clonetech, Mountain, USA)试剂盒说明书。

1.4 酵母双杂交 cDNA 文库构建

解剖获得斜纹夜蛾变态发育不同时期(6 龄幼虫中期、预蛹中期和蛹中期)的不同组织(中肠、脂肪体和表皮),采用 OMEGA Total RNA Ⅱ 试剂盒(广州斯佳生物公司)提取各组织总 RNA。随后,将总 RNA 均匀混合,用于后续文库的构建。采用 SMART MMLV Reverse Transcriptase 反转录成 cDNA。根据已有的接头序列,采用试剂盒提供的 5′-和 3′-PCR primer(表 1)扩增双链 cDNA,经 CHROMA SPIN TE-400 纯化柱获得纯化的 dscDNA。具体操作参见 Make Your Own "Mate & Plate™" Library System (Clonetech, Mountain, USA)试剂盒说明书。将 dscDNA 与 pGADT7-Rec 共转化 Y187 感受态细胞,收集菌液,即为酵母双杂交 cDNA 文库。

1.5 文库转化效率

分别取稀释了 10, 100 和 1 000 倍的文库菌液涂布于直径为 100 mm SD/-Leu 琼脂平板,30℃倒置培养 3 ~ 5 d,按如下公式计算文库转化效率:

$$\text{文库转化效率} = \frac{\text{菌落个数} \times \text{文库总体积(mL)}}{\text{涂布总体积(mL)} \times \text{DNA 总量(μg)}} \quad (1)$$

1.6 文库插入片段大小

随机挑取 24 个单菌落,于 1 mL YPDA 液体培养基扩大培养,12 000 r/min 离心收集菌体细胞,于沸水中水浴 5 min,迅速至于冰上 2 min,交替 3 次,以破碎酵母菌细胞壁。以破壁后的菌液为模板,用 5′-和 3′-primer 通过 PCR 扩增检测插入片段的大小。

1.7 文库滴度检测

在进行后续筛选前,要先计算文库滴度,确保文库滴度大于 1×10^7 cfu/mL,具体方法如下:吸取 10 μL文库菌液,用 YPDA 培养液将其稀释大约 10^4 倍,涂布于 SD/-Leu 琼脂平板上,30℃倒置培养 3 ~ 5 d,计算平板上菌落,按如下公式计算文库滴度:

$$\text{文库滴度} = \frac{\text{菌落个数}}{\text{涂布体积(mL)}} \times \text{稀释倍数} \quad (2)$$

1.8 EcR/USP 互作蛋白筛选

将 4 种诱饵质粒分别转化 AH109 感受态细胞,用 1 mL 0.9% (w/v) NaCl 溶液重悬后涂布于 SD/-Trp。挑取一个 AH109 单菌落于 50 mL SD/-Trp 液体培养基中,30℃ 250 r/min 培养 16 ~ 20 h 至 OD_{600} = 0.8;室温 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;用 4 ~ 5 mL SD/-Trp 重悬沉淀,使细胞密度大于 1×10^8 个/mL;将 1 mL cDNA 文库菌液(Y187)和 4 ~ 5 mL 诱饵菌株菌液(AH109)加入 2 L 干净无菌的锥形瓶中,30℃ 30 ~ 50 r/min 培养 20 ~ 24 h 使其融合;收集菌体,用 50 mL 0.5 × YPDA/Kan^+ 清洗锥形瓶,并重悬沉淀,室温 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清;用 10 mL 0.5 × YPDA/Kan^+ 重悬,分别取 100 μL 菌悬液涂布于 SD/-Trp, SD/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu 平板以计算转化效率和重组率;将剩余的菌液每 200 μL 涂布于 150 mm 的 SD/-Trp/-Leu/-His 平板;将 SD/-Trp/-Leu 平板上长出的二倍体酵母菌落挑至 100 μL 0.9% (w/v) NaCl 中,取 2 μL 点在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal 平板上,重复 2 次。长出的蓝色菌落即为候选阳性单克隆。采用酵母质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取质粒。将质粒转化大肠杆菌 DH5α,然后将经 PCR 验证好的菌液进行测序分析(华大基因,深圳),最后 blastn (NCBI)比对分析获得各互作蛋白的基因名称。

1.9 蛋白互作关系的进一步验证

通过大范围文库筛选,获得了一些阳性的蓝色菌落,并通过测序获得了其对应的互作蛋白的基因名称。在此基础上,选择了某些可能的靶蛋白(主要是一些可能调控蜕皮激素受体功能的蛋白,如分子伴侣、泛素化修饰相关的蛋白等),采用两两杂交(融合)的方式,在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal 平板上进行了二次筛选。同时,考虑到酵母双杂交具有一定的假阳性,我们采用 Far-Western 法进一步对鉴定出来的互作蛋白进行蛋白互作分析。实验方法参照 Huang 等(2015),具体步骤简述如下:将 Ni 柱纯化的 DnaJ-5 先经 SDS-PAGE 电泳分离,

然后转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,孵育 anti-EcR(15c3, DSHB, 美国)。与 USP1 存在互作关系的 Hsp70(Shen *et al.*, 2014)和另外一无关蛋白 GSTe3 (24 kD)(Deng *et al.*, 2009)分别作为阳性和阴性对照。

2　结果

2.1　诱饵质粒毒性和自激活效应

由于诱饵质粒对宿主细胞没有明显的毒性作用,也不能具有自激活效应,我们首先检查了 4 种诱饵质粒(EcRA/pGBKT7, EcRB1/pGBKT7, USP1/pGBKT7,USP2/pGBKT7)对宿主细胞 AH109 的毒性作用。如图 1 所示,4 种诱饵质粒在稀释 10 倍(×10)和 100 倍(×100)的培养基上生长状况没有显著的差异,这意味着它们对宿主细胞没有明显的毒性作用。此外,我们以试剂盒提供的阳性互作质粒(pGBKT7-53 和 pGADT7-T)为阳性对照,以 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T 作为阴性对照,采用融合法检测了 4 种诱饵质粒与 pGADT7 空质粒的蛋白互作,即自激活性效应。4 种诱饵质粒在 SD/-Trp/-Leu 培养基均正常生长,说明转化成功;另外,仅阳性对照组在 SD/-Trp/-Leu/-His/X-α-Gal 培养基上生长,并且呈蓝色,其他组均不能生长(图 2),这说明 4 种诱饵质粒不存在自激活性效应。

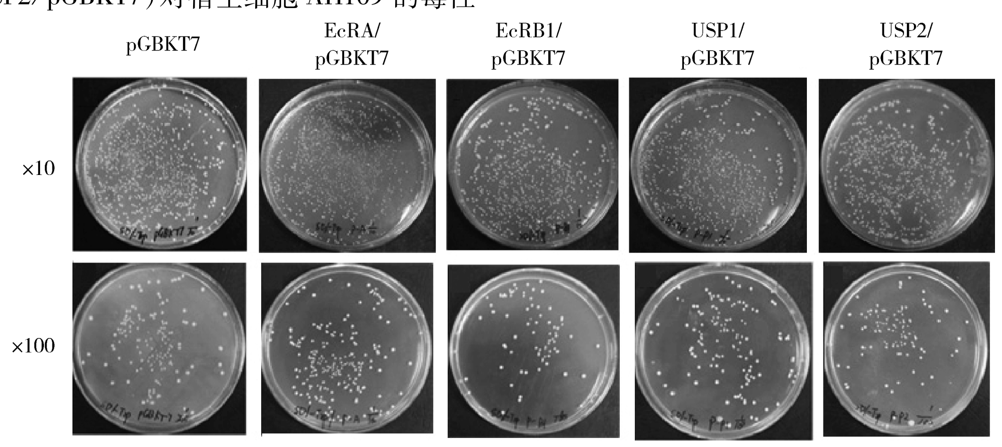


图 1　诱饵质粒对宿主细胞的毒性检测

Fig. 1　Toxicity of bait plasmids to the host cells

×10：稀释 10 倍 1∶10 Dilution；×100：稀释 100 倍 1∶100 Dilution.

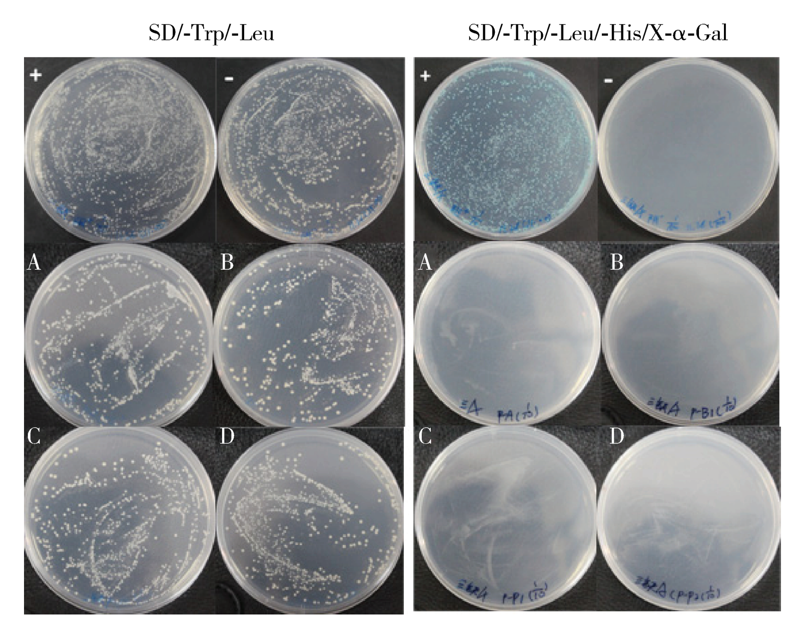


图 2　诱饵质粒自激活性检测

Fig. 2　Autoactivation of bait plasmids

+：pGBKT7-53/pGADT7-T(阳性对照 Positve control)；－：pGBKT7-Lam/pGADT7-T(阴性对照 Negative control). A：EcRA /pGBKT7；B：EcRB1/pGBKT7；C：USP1/pGBKT7；D：USP2/pGBKT7.

2.2 文库转化效率

以稀释 100 和 1 000 倍的文库菌液涂布，根据生长的菌落数，依据 1.5 节公式 1 计算得到文库平均转化效率为 3.0×10^6 cfu/μg(表 2)。

表 2 文库转化效率

Table 2 Statistics of library transformation efficiency

单菌落个数 Number of clones	涂布体积(mL) Volume of spreading	稀释倍数 Dilution fold	转化效率(cfu/μg) Transformation efficiency
92	0.1	1 000	3.6×10^6
616	0.1	100	2.4×10^6

2.3 文库插入片段

从文库中随机挑取 24 个单菌落，采用 PCR 法检测文库插入片段大小。结果显示，文库插入片段大部分在 500 ~ 2 000 bp 之间(图 3)。

2.4 文库滴度

在 SD/-Leu 琼脂平板上涂布了 50 μL、稀释 10^4 倍的文库菌液，在平板上长出了 666 个单克隆，依据 1.6 节公式 2 计算得出文库滴度达到 1.3×10^8 cfu/mL。

2.5 EcR/USP 互作蛋白

采用融合法在筛选平板 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-Gal 上获得了 110 个蓝色菌落，其中与 EcRB1，USP1 和 USP2 互作的阳性蛋白数分别为 26，52 和 32 个，未能筛选到与 EcRA 互作的蛋白(表 3)。

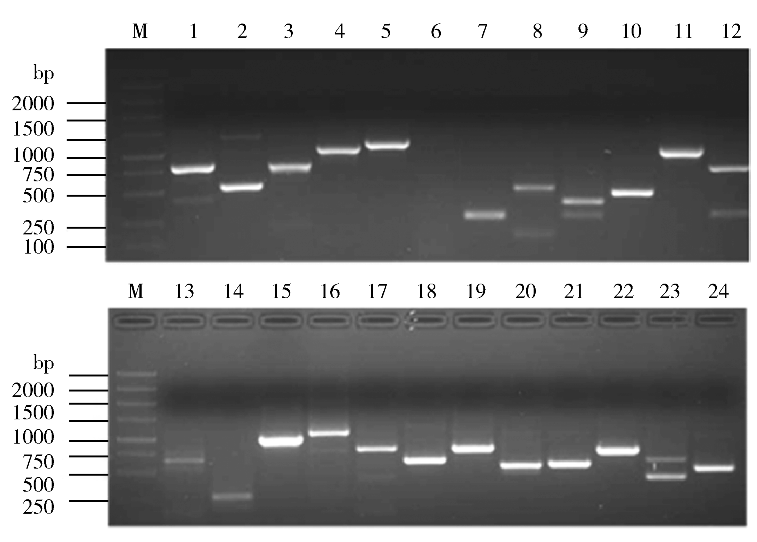


图 3 文库插入片段检测

Fig. 3 Electrophoresis test of the inserted fragments

M: DL5000 Marker; 1 – 24: PCR 扩增片段 PCR-amplified fragments.

表 3 蜕皮激素受体(EcR/USP)互作蛋白

Table 3 Interacting proteins of EcR/USP

互作蛋白 Interacting proteins	克隆数 Number of clones	GenBank 登录号 GenBank accession no.
EcRB1 互作蛋白 Interacting proteins with EcRB1 (26)		
Stubarista	5	AK402822
Uncharacterized LOC101746322 (LOC101746322)	3	XM_004923389
MBF2	3	AB012298
Hypothetical protein	2	XM_001655725
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2	HQ012003
β-actin	1	EU035314
Dynein heavy chain, cytoplasmic-like (LOC101742268)	1	XM_004929712
Putative cytoplasmic actin variant 2 (A3bv2)	1	AY646107
Polyubiquitin	1	AB122067
Moderately methionine rich storage protein (SL-2 beta gene)	1	AJ249469
Beta-tubulin	1	EU234504
BAC, egg DNA	1	FP340420
REPAT31	1	JQ619213
NEDD8-like (LOC101744114), mRNA	1	XM_004923916

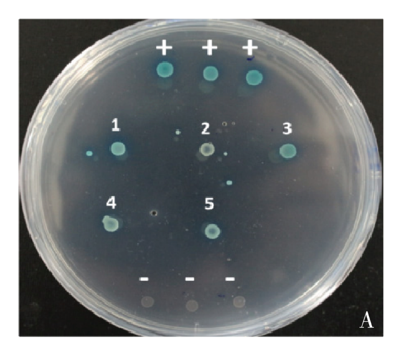
续表 3　Table 3 continued

互作蛋白 Interacting proteins	克隆数 Number of clones	GenBank 登录号 GenBank accession no.
Ecdysteroid regulated 16 kDa (esr16) mRNA, complete cds	1	XM_004928502
Apolipophorin III	1	EU016399
USP1 互作蛋白 Interacting proteins with USP1 (52)		
Ribosomal protein L37 mRNA, complete cds	6	AF400199.1
REPAT31 mRNA, complete cds	5	JQ619213.1
PREDICTED: uncharacterized LOC101746322 (LOC101746322), mRNA	4	XM_004923389.1
BAC, egg DNA	3	FP340418.1
Beta-tubulin mRNA, complete cds	3	EU234504.1
Ecdysteroid regulated 16 kDa (esr16) mRNA, complete cds	3	U31456.1
Chromosome 28 microsatellite S2801-R sequence	3	DQ243176.1
Clone: ftes05P22	2	AK379144.1
Ribosomal protein S20 mRNA, complete cds	2	AF400217.1
ATCC 50818 ATP synthase subunit gamma (PTSG_02580) mRNA, complete cds	2	XM_004996020.1
Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete sequence	2	AE014187.2
mRNA, clone: ftes25H21	2	AK379726.1
DnaJ (Hsp40) homolog 5 (DnaJ-5), mRNA	1	NM_001043525.1
Alpha-L-fucoside fucohydrolase mRNA, complete cds	1	KC832290.1
mRNA for unknown unsecreted protein, complete cds, sequence id: Pp-1143, expressed in epidermis	1	AK405486.1
mRNA, clone: fepM27E12	1	AK383103.1
PREDICTED: sarcoplasmic calcium-binding protein-like (LOC101741700), mRNA	1	XM_004922671.1
Clone SCY622 mRNA sequence	1	KF860461.1
Serine proteinase (SP) mRNA, complete cds	1	JF412652.1
Serine/threonine protein kinase Akt mRNA	1	JN399217.1
mRNA, clone: SMG010045B06, expressed in submaxillary gland	1	AK397524.1
PREDICTED: non-lysosomal glucosylceramidase-like (LOC101743464), mRNA	1	XM_004929436.1
cDNA clone IMAGE:7669450	1	BC128644.1
Predicted gene 5941 (Gm5941), mRNA	1	NM_001034103.1
DNA sequence from clone DKEY-93E24 in linkage group 10, complete sequence	1	CR790388.17
PREDICTED: rRNA 2′-O-methyltransferase fibrillarin-like (LOC101742289), mRNA	1	XM_004923101.1
Clone 6715 putative peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 mRNA, partial cds	1	KJ622094.1
USP2 互作蛋白 Interacting proteins with USP2 (32)		
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, complete cds	6	HQ012003.2
mRNA for cuticular protein PxutCPR146, partial cds, sequence id: Px-0189, expressed in epidermis	4	AK402735.1
PREDICTED: uncharacterized LOC101746322 (LOC101746322), mRNA	2	XM_004923389.1
mRNA for MBF2, complete cds	2	AB012298.1
REPAT32 mRNA, complete cds	2	JQ660354.1
Genome assembly common carp genome, scaffold LG13	2	LN590687.1
mRNA, clone: fwd-02H12	1	AK405815.1
Ecdysteroid regulated 16 kDa (esr16) mRNA, complete cds	1	U31456.1
BAC, egg DNA	1	FP340420.1
Ribosomal protein L12 mRNA, complete cds	1	AF429974.1
PREDICTED: sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2-like (LOC101745725), mRNA	1	XM_004929092.1
mRNA, clone: fwd-02H12	1	AK405815.1
Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete sequence	1	AE014187.2
Clone IMAGE:4096523, mRNA	1	BC016733.1
Putative cytoplasmic actin variant 2 (A3bv2) mRNA, partial cds	1	AY646107.1
mRNA, clone: fphe05H21	1	AK385724.1
mRNA for moderately methionine rich storage protein (SL-2 beta gene)	1	AJ249469.1
3D7 chromosome 5	1	AL844504.1
Clone J_080 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1	KC413876.1
Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 8	1	AL844507.2

括号中数值示互作蛋白的数量。Numerals in brackets are the number of interacting proteins.

2.6 互作关系验证

考虑到大范围筛选可能存在一定的假阳性，我们选取了 5 种蛋白：DnaJ-5（Hsp40 homolog 5），MBF2（mediator of BmFTZ-F1 type 2），esr16（ecdysteroid regulated 16 kDa）protein，polybiquitin 和 NEDD8-like（neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8），采用酵母双杂交法检测了它们与蜕皮激素受体间的蛋白质互作关系。结果发现，DnaJ-5 和 USP1 互作；MBF2 同时与 EcRB1 和 USP2 互作；esr16 和 EcRB1，USP1，USP2 互作；polyubiquitin 和 EcRB1 互作；NEDD8-like 和 EcRB1 互作（图 4）。这些结果与大范围筛选获得的结果（表 3）基本一致。Far-Western 印迹实验结果表明（图 5），DnaJ-5 能够与 USP1 互作，两者之间具有互作关系。



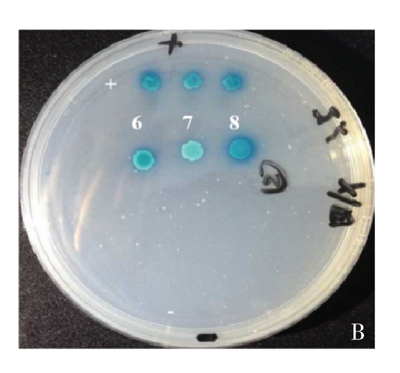


图 4 酵母双杂交验证蛋白互作关系

Fig. 4 Protein-protein interaction identified by yeast two-hybrid

+ ：pGBKT7-53/pGADT7-T（阳性对照 Positive control）；－：pGBKT7-Lam/pGADT7-T（阴性对照 Negative control）；1：EcRB1 与 polyubiquitin 互作 Interaction between EcRB1 and polyubiquitin；2：EcRB1 与 NEDD8-like 互作 Interaction between EcRB1 and NEDD8-like；3：USP1 与 DnaJ-5 互作 Interaction between USP1 and DnaJ-5；4：USP2 与 MBF2 互作 Interaction between USP2 and MBF2；5：EcRB1 与 esr16 互作 Interaction between EcRB1 and esr16；6：EcRB1 与 MBF2 互作 Interaction between EcRB1 and MBF2；7：USP1 与 esr6 互作 Interaction between USP1 and esr6；8：USP2 与 esr16 互作 Interaction between USP2 and esr16.

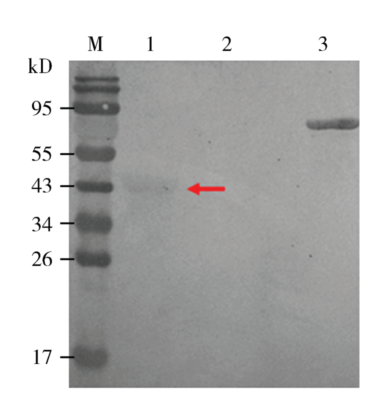


图 5 Far-Western 验证 USP1 与 DnaJ-5 之间的蛋白互作关系

Fig. 5 Protein-protein interaction between USP1 and DnaJ-5 detected by Far-Western

M：Protein marker；1：DnaJ-5；2：GST（阴性对照 Negative control）；3：Hsp70（阳性对照 Positive control）. 红色箭头所指为 DnaJ-5 蛋白。The band of DnaJ-5 is indicated with a red arrow.

3 讨论

3.1 酵母双杂交文库的质量和假阳性

通常一个 cDNA 筛选文库应该包含至少 3.3×10^5 cfu，以保证文库的完整性和覆盖度（王永虎，2013）。本研究中文库转化效率达到 3.0×10^6 cfu/μg，文库滴度达到 1.3×10^8 cfu/mL。这些指标说明本研究构建的斜纹夜蛾酵母双杂交文库质量较高。

假阳性是构建酵母双杂交文库时需要认真考虑的问题。由于一些蛋白质（如一些转录因子）本身具有激活转录能力，或在酵母中表达时发挥转录激活作用，即自激活性，这将导致假阳性的产生。因此，构建诱饵质粒时首先要排除自激活性。另外有些蛋白表面含有对多种蛋白质的低亲和力区域，能与其他蛋白形成稳定的复合物，从而引起报告基因的表达，产生假阳性（张莉和黄倢，2006）。在酵母双杂交系统的应用中，有多种方法可以在一定程度上减少假阳性的产生。例如采用双筛选系统以减少假阳性的发生。双筛选系统用两种不同的报告基因（*lacZ* 和 *HIS3*），它们的表达需要不同的启动子（Harper *et al.*，1993）。双筛选系统可明显减少假阳性。在本研究中，我们采用的酵母双杂交系统需要 3 个不同启动子；此外在实验中通过严格的多轮营养缺陷型筛选也可大幅降低假阳性的产生。尽管如此，可能仍然不能完全避免假阳性，这就需要采用其

他蛋白互作方法如 Far-Western 法等来进一步验证。

本研究筛选得到的蛋白中有不少为结构蛋白，如 actin 和 β-tubulin 等。这些蛋白是否调控蜕皮激素受体的功能还需要进一步加以验证。此外，已有文献报道 EcR 或 USP 能够与多种蛋白质，例如 Hsc70（Zheng *et al*., 2010）、TAI（Bai *et al*., 2000）和 MET（Bitra and Palli, 2009）等产生蛋白质互作。然而，在本研究中我们通过酵母双杂交文库并未筛选到这几种蛋白质。一方面，某些结构蛋白丰度过高，可能造成筛选过程中出现一定的假阳性。另一方面，在本研究中，我们构建酵母双杂交 cDNA 文库时并没有进行均一化处理，这会使得丰度低的蛋白（如某些转录因子等）在文库中出现的概率偏低，从而不容易被筛选到。针对这一情况，我们拟在后续研究中重新构建均一化的 cDNA 文库，这可能有助于提高低丰度蛋白被筛选到的机率，降低假阳性的风险。

3.2 分子伴侣可能对蜕皮激素功能调控起重要作用

热激蛋白分子伴侣是哺乳动物甾醇类核受体复合物的重要组成部分，例如 Hsp90、Hsp70 等广泛存在于多种甾醇类核受体复合物中（Pratt and Toft, 1997; Pratt *et al*., 2004）。在棉铃虫中也发现 Hsc70 能够与 USP1 互作，从而调节 USP1 的亚细胞定位（Zheng *et al*., 2010）。在斜纹夜蛾中，EcR 能够与 Hsp70（或 Hsc70）免疫共沉淀（Shen *et al*., 2014）。这些结果说明热激蛋白分子伴侣可以通过与蜕皮激素受体互作，从而对其功能产生显著的调控。DnaJ 是 Hsp40 基因家族成员，它主要作为分子伴侣调控 Hsp70 的功能（Caplan *et al*., 1993）。另外，DnaJ 通过 J-domain 作用驱使 Hsp70-ATP 向 Hsp70-ADP 的转变来加固 Hsp70 和靶蛋白的结合（Cyr *et al*., 1994; Fan *et al*., 2003）。本研究表明，DnaJ-5 与 USP1 存在蛋白质相互作用。这意味着 DnaJ 很可能协助 Hsp/Hsc70 参与 EcR 或 USP 的细胞核定位，从而对蜕皮激素受体的功能产生一定的调控作用。

3.3 泛素化修饰可能参与蜕皮激素受体功能的调节

泛素是一类在真核生物中普遍存在的高保守蛋白，它可以通过泛素单体、多聚泛素来为底物蛋白贴上泛素标签从而使底物降解。不同的泛素分子之间可以通过共价键结合形成多聚泛素链。不同构型的多聚泛素链发挥不同功能。多聚泛素链的功能不仅局限在和蛋白酶体作用而使得底物蛋白降解，也有很多研究证明了多聚泛素链的其他非蛋白降解功能。Lys29-linked 多聚泛素链和 Lys33-linked 多聚泛素链可以通过修饰一类蛋白激酶而影响其功能（Al-Hakim *et al*., 2008）；Lys48-linked 多聚泛素链可以对酵母中的一种转录因子 Met4 的功能进行调控（Kaiser *et al*., 2000; Flick *et al*., 2006）。本研究结果显示，EcRB1 和多聚泛素（polyubiquitin）存在蛋白间的互作，这意味着多聚泛素对蜕皮激素受体 EcRB1 也可能存在相应的调控作用。具体的作用方式还需要进一步深入研究。

3.4 其他参与蜕皮激素受体功能调控的蛋白

esr16（ecdysteroid regulated 16 kDa）是 E1 大家族中的一员（Kanaya and Kobayashi, 2000），在神经系统中以及其周围导管的上皮细胞特异性表达。在烟草天蛾 *Manduca sexta* 中的研究发现，*esr*16 在化蛹前上调表达，且表达水平随着蜕皮激素滴度的升高逐渐下降（Mésźaros and Morton, 1996）。这预示着 esr16 受到蜕皮激素(20E)的负调控。此外，鉴定出的斜纹夜蛾 *esr*16 与柑橘凤蝶 *Papilio xuthus* niemann-pick type C-2a（NPC-2a）基因（GenBank 登录号：BAM18090）具有 64% 的氨基酸序列一致性。这意味着，*esr*16 也可能具有 NPC 基因的功能。在果蝇中的研究表明，NPC-2 可以调节昆虫体内甾醇的平衡，并且影响 20E 的生物合成（Fluegel *et al*., 2006; Huang *et al*., 2007）。这一研究结果说明，esr16（或者 NPC-2）不仅受到 20E 的调控，它还可能对 20E 的生物合成产生反馈调节。本研究发现，esr16 与蜕皮激素受体 EcRB1 和 USP1 存在相互作用。这进一步暗示，esr16 可能通过与蜕皮激素受体的相互作用而参与 20E 信号途径的调控。

MBF2 是转录因子 FTZ-F1 的一个共激活子。MBF2 最早是在家蚕中作为辅助因子与 TFIIA 的相互作用，共同激活转录而被分离出来的（Liu *et al*., 2000）。目前仅在 3 种鳞翅目昆虫（家蚕 *Bombyx mori*，野桑蚕 *Bombyx mandarina* 和眉纹天蚕蛾 *Samia cynthia*）中发现。Liu 等（2000）研究发现，在家蚕 4 龄幼虫第 3 天时，MBF2 和另一转录共激活子 MBF1 由细胞质进入细胞核，MBF1 作为桥梁连接 MBF2，FTZ-F1 和 TBP，从而形成一种复合物；并且 MBF1 可加强 FTZ-F1 在启动子结合部位的结合，从而激活基因的表达（Li *et al*., 1994），发挥转录共激活子活性。在本研究中，我们发现 MBF2 可以和蜕皮激素受体 EcR 和 USP 相互作用。MBF2 是否也可以以一种类似的机制调控核受体 EcR/USP 的功能，需要进一步深入研究。

参考文献（References）

Al-Hakim AK, Zagorska A, Chapman L, Deak M, Peggie M, Alessi DR, 2008. Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys29/Lys33-linked polyubiquitin chains. *Biochem. J.*, 411: 249 – 260.

Arbeitman MN, Hogness DS, 2000. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell*, 101: 67 – 77.

Bai J, Uehara Y, Montell DJ, 2000. Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIBI, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell*, 103: 1047 – 1058.

Bitra K, Palli SR, 2009. Interaction of proteins involved in ecdysone and juvenile hormone signal transduction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 70: 90 – 105.

Burtis KC, Thummel CS, Jones CW, Karim FD, Hogness DS, 1990. The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell*, 61: 85 – 99.

Caplan AJ, Cyr DM, Douglas MG, 1993. Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* dnaJ: a diverse protein family that functions with Hsp70 stress proteins. *Mol. Biol. Cell*, 4: 555 – 563.

Cyr DM, Langer T, Douglas MG, 1994. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.*, 19(4): 176 – 181.

Deng H, Huang Y, Feng Q, Zheng S, 2009. Two epsilon glutathione S-transferase cDNAs from the common cutworm, *Spodoptera litura*: characterization and developmental and induced expression by insecticides. *J. Insect Physiol.*, 55: 1174 – 1183.

DiBello PR, Withers DA, Bayer CA, Fristrom JW, Guild GM, 1991. The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics*, 129: 385 – 397.

Dressel U, Thormeyer D, Altincicek B, Paululat A, Eggert M, Schneider S, Tenbaum SP, Renkawitz R, Baniahmad A, 1999. Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 3383 – 3394.

Fan CY, Lee S, Cyr DM, 2003. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones*, 8: 309 – 316.

Fields S, Song O, 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245 – 246.

Flick K, Raasi S, Zhang H, Yen JL, Kaiser P, 2006. A ubiquitin-interacting motif protects polyubiquitinated Met4 from degradation by the 26S proteasome. *Cell Biol.*, 8: 509 – 515.

Fluegel FL, Parker TJ, Pallanck J, 2006. Mutations of a *Drosophila* NPC1 gene confer sterol and ecdysone metabolic defects. *Genetics*, 172: 185 – 196.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ, 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cipl is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4): 16, 805.

Henrich VC, 2009. The ecdysteroid receptor. In: Gilbert LI ed. Insect Development. Academic Press, London. 262 – 303.

Huang LX, Gong YJ, Gu J, Zeng BJ, Huang LH, Feng QL, 2015. Expression, subcellular localization and protein-protein interaction of four isoforms of EcR/USP in the common cutworm. *Insect Sci.*, 22: 95 – 105.

Huang X, Warren JT, Buchanan J, Gilbert LI, Scott MP, 2007. *Drosophila* Niemann-Pick Type C-2 genes control sterol homeostasis and steroid biosynthesis: a model of human neurodegenerative disease. *Development*, 134: 3733 – 3742.

Huang YF, Xu ZB, Lin XY, Feng QL, Zheng SC, 2011. Structure and expression of glutathione S-transferase genes from the midgut of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Noctuidae) and their response to xenobiotic compounds and bacteria. *J. Insect Physiol.*, 57: 1033 – 1044.

Jindra M, Huang JY, Malone F, Asahina M, Riddiford LM, 1997. Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*. *Insect Mol. Biol.*, 6: 41 – 53.

Jindra M, Malone F, Hiruma K, Riddiford LM, 1996. Developmental profiles and ecdysteorid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.*, 180: 258 – 272.

Kaiser P, Flick K, Wittenberg C, Reed SI, 2000. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF (Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell*, 102: 303 – 314.

Kanaya T, Kobayashi J, 2000. Purification and characterization of an insect haemolymph protein promoting *in vitro* replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 81: 1135 – 1141.

Lan LN, Zhong YB, Liu SM, Chen RB, 2009. Outbreak reasons and control measures of *Spodoptera litura*. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 15(1): 75, 146. [蓝良能, 钟永保, 刘盛免, 陈日波, 2009. 斜纹夜蛾的暴发原因及防治措施. 安徽农学通报, 15(1): 75, 146]

Li FQ, Ueda H, Hirose S, 1994. Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-Fl. *Mol. Cell. Biol.*, 14(5): 3013 – 3021.

Liu QX, Ueda H, Hirose S, 2000. MBF2 is a tissue- and stage-specific coactivator that is regulated at the step of nuclear transport in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, 225: 437 – 446.

Mészáros M, Morton DB, 1996. Comparison of the expression patterns of five developmentally regulated genes in *Manduca sexta* and their regulation by 20-hydroxyedysone *in vitro*. *J. Exp. Biol.*, 199: 1555 – 1561.

Nagpal S, Ghosn C, DiSepio D, Molina Y, Sutter M, Klein ES, Chandraratna RAS, 1999. Retinoid-dependent recruitment of a histone H1 displacement activity by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.*, 274: 22563 – 22568.

Papaioannou M, Melle C, Baniahmad A, 2007. The coregulator Alien. *Nucl. Recept. Signal.*, 5: 1 – 8.

Perera SC, Ladd TR, Dhadialla TS, Krell PJ, Sohi SS, Retnakaran A, Palli SR, 1999. Studies on two ecdysone receptor isoforms of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Mol. Cell. Endocrinol.*,

152: 73 - 84.

Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ, 2004. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem.*, 40: 41 - 58.

Pratt WB, Toft DO, 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 18(3): 306 - 360.

Riddford LM, 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone 1. General considerations and premetamorphoic actions. *Adv. Insect Physiol.*, 24: 213 - 274.

Sedkov Y, Cho E, Petruk S, Cherbas L, Smith ST, Jones RS, Cherbas P, Canaani E, Jaynes JB, Mazo A, 2003. Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature*, 426: 78 - 83.

Shen Y, Gong YJ, Gu J, Huang LH, Feng QL, 2014. Physiological effect of mild thermal stress and its induction of gene expression in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.*, 61: 34 - 41.

Swevers L, Drevet JR, Lunke MD, Iatrou K, 1995. The silkmoth homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 isoform): cloning and analysis of expression during follicular cell differentiation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25: 857 - 866.

Talbot WS, Swywryd EA, Hogness DS, 1993. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to edysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, 73: 1323 - 1337.

Tsail C, Kao H, Yao T, McKeown M, Evans RM, 1999. SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR mediated repression is critical for development. *Mol. Cell*, 4: 175 - 186.

Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM, 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403: 623 - 627.

Van Alest L, Barr M , Marcus S , Polverino A , Wigler M, 1993. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6213 - 6217.

Wang SF, Li C, Sun G, Zhu J, Raikhel AS, 2002. Differential expression and regulation by 20-hydroxyecdysone of mosquito ecdysteroid receptor isoforms A and B. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 196: 29 - 42.

Wang YH, 2013. Identification of BR-C Interacting Proteins in *Bombyx mori* Using Yeast Two-hybrid System. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [王永虎, 2013. 利用酵母双杂交系统筛选家蚕 BR-C 转录因子的相互作用蛋白. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Zhang L, Huang J, 2006. The improvement and advance in research of yeast two-hybrid system. *Transaction of Oceanology and Limnology*, (1): 108 - 116. [张莉, 黄倢, 2006. 酵母双杂交系统的改进与研究进展. 海洋湖沼通报, (1): 108 - 116]

Zheng WW, Yang DT, Wang JX, Song QS, LI G, Zhao XF, 2010. Hsc70 binds to ultraspiracle resulting in the upregulation of 20-hydroxyecdsone-responsive genes in *Helicoverpa armigera*. *Mol. Cell Endocrinol.*, 315: 282 - 291.

(责任编辑: 袁德成)